

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



LES BREVETS INTERNATIONAUX PUBLIÉS EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(43) Date de la publication internationale
8 mars 2001 (08.03.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 01/15654 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷: A61K

Jacqueline [FR/FR]; 65, Deuxième Avenue, F-60260
Lamorlaye (FR). LETOURNEUR, Didier [FR/FR]; 17,
Rue de la Fosse Bazin, F-92350 Le Plessis Robinson (FR).
MILLET, Jean [FR/FR]; 15, Rue du Tremblois, F-21910
Corcelles Les Citeaux (FR).

(21) Numéro de la demande internationale:
PCT/FR00/02421

(22) Date de dépôt international:
1 septembre 2000 (01.09.2000)

(74) Mandataires: VIALLE-PRESLES, Marie-José etc.,
Cabinet Ores, 6 Avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).

(25) Langue de dépôt: français

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:
99/10965 1 septembre 1999 (01.09.1999) FR

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US):
INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR
L'EXPLOITATION DE LA MER (IFREMER)
[FR/FR]; 155 Rue Jean-Jacques Rousseau, F-92138 Issy
Les Moulineaux Cedex (FR). CENTRE NATIONAL DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR];
3 Rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). UNI-
VERSITÉ RENE DESCARTES (PARIS V) [FR/FR];
12 Rue de l'Ecole de Médecine, F-75006 Paris (FR).

Publiée:

— Sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport.

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): COL-
LIEC-JOUAULT, Sylvia [FR/FR]; 15, Rue de la
Bourgeonnière, F-44300 Nantes (FR). DURAND, Patrick
[FR/FR]; 61 Rue de la Commune de 1871, F-44400
Rèze (FR). FISCHER, Anne-Marie [FR/FR]; 64, Rue
de la Colonie, F-75013 Paris (FR). JOZEFONVICZ,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: USE OF A LOW MOLECULAR WEIGHT SULPHATED POLYSACCHARIDE TO OBTAIN A MEDICINE WITH
ANTITHROMBOTIC ACTIVITY

(54) Titre: UTILISATION D'UN POLYSACCHARIDE SULFATE DE BAS POIDS MOLECULAIRE POUR L'OBTENTION
D'UN MÉDICAMENT ACTIF CONTRE LA THROMBOSE VASCULAIRE

(57) Abstract: The invention concerns the use of a sulphated polysaccharide capable of being obtained by radical depolymerization
of a raw fucan derived from Pheophyceae, said polysaccharide having a molar mass not more than 10.000 g/mol, to obtain a medicine
for preventing or treating vascular thrombosis, in particular venous thrombosis, arterial thrombosis and arterial restenosis.

(57) Abrégé: La présente invention est relative à l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté susceptible d'être obtenu par dépolymé-
risation radicalaire d'un fucane brut issu de Pheophycées, ledit polysaccharide ayant une masse molaire inférieure ou égale à 10
000 g/mol, pour l'obtention d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose vasculaire, notamment de la
thrombose veineuse, de la thrombose artérielle et de la resténose artérielle.

WO 01/15654 A2

UTILISATION D'UN POLYSACCHARIDE SULFATE DE BAS POIDS
MOLECULAIRE POUR L'OBTENTION D'UN MEDICAMENT ACTIF CONTRE
LA THROMBOSE VASCULAIRE

La présente invention a pour objet
5 l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté de masse molaire
inférieure ou égale à 10 000 g/mol, susceptible d'être
obtenu par dépolymérisation radicalaire d'un fucane brut
issu de Phéophycées, pour l'obtention d'un médicament
actif contre la thrombose artérielle et contre la
10 resténose artérielle.

La thrombose consiste en la formation d'un
caillot (thrombus) dans l'appareil circulatoire, caillot
qui obstrue la lumière du vaisseau dans lequel il se
forme. Elle est la conséquence de l'activation
15 pathologique des phénomènes physiologiques de l'hémostase,
c'est-à-dire des phénomènes qui concourent à la prévention
et à l'arrêt des saignements.

La thrombose met en jeu un processus complexe
impliquant l'activation en cascade de différents facteurs,
20 aboutissant à la formation de la thrombine, enzyme clé de
la coagulation, puis à la fibrinoformation. La formation
du thrombus débute par l'adhésion des plaquettes au tissu
conjonctif sous-endothélial, mis à nu par une lésion de
l'endothélium vasculaire. Les plaquettes s'agrègent entre
25 elles et l'agrégat s'entoure d'un réseau de fibrine, qui
emprisonne également des globules blancs et des globules
rouges, formant le thrombus.

La thrombose artérielle diffère de la
thrombose veineuse en ce qu'elle survient le plus souvent
30 sur une artère lésée par la présence d'une plaque
d'athérome ; cette lésion se caractérise en outre par la
prolifération et la migration vers l'intima des cellules
musculaires lisses de la media. La thrombose artérielle se
produit souvent lors de la rupture de la plaque
35 d'athérome, avec perte de continuité de l'endothélium
vasculaire. L'adhésion et l'agrégation des plaquettes

jouent un rôle primordial dans le phénomène de thrombose artérielle.

L'ensemble du processus de réponse à la lésion d'une artère implique de nombreux phénomènes biologiques cellulaires mettant en jeu des modifications du phénotype
5 des cellules musculaires lisses (CML), ainsi que l'expression de facteurs de croissance qui favorisent la prolifération des cellules endothéliales.

Dans le traitement de la thrombose veineuse,
10 on utilise classiquement des anticoagulants, notamment l'héparine, qui possèdent la propriété d'inhiber la thrombine et sa formation.

L'héparine est un polysaccharide sulfaté constitué d'unités de glucosamine et d'acides uroniques
15 liées en 1-4, dans lesquelles les groupes sulfates sont présents sur la fonction amine de la glucosamine et/ou sur des fonctions alcools de la glucosamine et de l'acide uronique. Ce polysaccharide, dont les propriétés anticoagulantes sont bien connues, est actuellement
20 largement utilisé dans le traitement des accidents thrombotiques. L'héparine présente toutefois des effets secondaires très importants (saignements, risques de thrombopénies immuno-allergiques) et elle est très peu efficace en thrombose artérielle. De plus, l'origine
25 animale de ce produit est susceptible d'entraîner un risque potentiel de contamination par des agents infectieux non conventionnels.

Des techniques de dépolymérisation chimique ou enzymatique ont permis d'obtenir, à partir d'HNF (héparine
30 non fractionnée, dont le poids moléculaire est d'environ 15 000 g/mol), des chaînes polysaccharidiques de bas poids moléculaire, à savoir de poids moléculaire compris entre 2 000 et 10 000 g/mol, nommées HBPM (Héparines de Bas Poids Moléculaire). De nombreuses HBPM ont été
35 synthétisées et sont notamment commercialisées sous les dénominations Enoxaparine®, Reviparine®, Dalteparine®,

Fraxiparine®, Tinzaparine®, Certoparine®, Opocrine®, Parnaparine®, etc.

Des études cliniques ont montré que, dans la prophylaxie des accidents thrombo-emboliques veineux, les HBPM possèdent une efficacité identique, sinon supérieure, à celle de l'HNF. Toutefois, les HBPM n'abolissent pas le risque hémorragique et peuvent entraîner, au même titre que l'HNF, quoique avec une moindre fréquence, une thrombopénie immuno-allergique.

D'autre part, il a été montré, en particulier par M. Lerch et al. (European Heart Journal, Août 1998, 19, 495) et H. Rickli et al. (European Heart Journal, Août 1998, 19, 470), que des HBPM (respectivement, Reviparin® et Fraxiparin®) sont inefficaces pour lutter contre la resténose après angioplastie, c'est-à-dire le phénomène de réapparition d'un rétrécissement de la lumière d'une artère lié à l'intervention d'une sonde à ballonnet en chirurgie vasculaire.

Il existe d'autres polysaccharides sulfatés que les héparines, par exemple les fucanes. Ces polysaccharides sulfatés, de poids moléculaire élevé (100 à 800 kDa), sont présents dans les parois cellulaires des thalles d'algues brunes. Il s'agit de polymères de L-fucose sulfaté qui peuvent également contenir du D-xylose, du D-galactose, du D-mannose et des acides uroniques, ces derniers n'étant pas sulfatés, contrairement à ceux de l'héparine. Les fucanes diffèrent également de l'héparine en ce qu'ils ne comprennent pas d'amino-sucres.

Les fucanes possèdent différentes propriétés qui rendent particulièrement intéressante leur exploitation dans de nombreux domaines thérapeutiques.

Il a notamment été montré que des fractions de fucane de faible masse molaire, obtenues par hydrolyse acide tel que décrit dans le Brevet européen 0 403 377, présentent une activité anticoagulante (S. Colliec et al.,

Thromb. Res., 1991, 64, 143-154) et antithrombotique par voie intraveineuse (S. Mauray et al., Thrombosis and Haemostasis, 1995, 74(5), 1280-1285) et par voie sous-cutanée (J. Millet et al., Thrombosis and Haemostasis, 1999, 81, 391-395) comparable à celle des héparines de bas poids moléculaires.

Il a également été montré que ces mêmes fractions de fucane sont capables d'inhiber, comme l'héparine, la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires en culture (D. Logeart et al., Eur. J. Cell. Biol., 1997, 74, 376-384 et 385-390). Les effets observés sont réversibles, ne sont pas liés à une action cytotoxique et dépendent de la concentration du composé dans le milieu de culture. Cet effet antiprolifératif sur la croissance des cellules musculaires lisses semble spécifique puisqu'il n'est noté, à ces concentrations, aucune inhibition sur la croissance de lignées fibroblastiques, et que ces composés sont capables de potentialiser la croissance de cellules endothéliales en culture (J. L. Giraux et al., Eur. J. Cell. Biol., 1998, 77, 352-359).

Giraux et al. ont montré, dans Thromb. Haemost., 1998, 80, 692-695, que ces mêmes fractions de fucane, obtenues par hydrolyse acide selon le protocole décrit dans le Brevet européen 0 403 377, induisent in vitro la libération de TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor) par les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain, effet qui pourrait contribuer à l'action antithrombotique de ces fractions de fucane.

D'autre part, il a été montré dans la Demande de Brevet EP 0 846 129 que des fragments de fucane, obtenus par dépolymérisation radicalaire d'un fucane de Phéophycées en présence d'un catalyseur métallique et de peroxyde d'hydrogène et possédant une masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol, conservent, in vitro, les propriétés anticoagulantes du fucane brut. De tels

fragments de fucane, obtenus par dépolymérisation radicalaire d'un fucane de haut poids moléculaire, sont différentes, quant à leur structure chimique, de fragments de fucane obtenus par hydrolyse acide d'un fucane brut, comme démontré dans la Demande de Brevet EP 0 846 129.

Outre l'HNF, les HBPM et les fucanes, d'autres agents anticoagulants ont été décrits pour leur action antithrombotique (inhibition de la formation du thrombus et/ou de sa croissance) : il s'agit notamment des héparinoïdes (mélange de glycosaminoglycanes de bas poids moléculaires, par exemple l'Orgaran[®] commercialisé par Organon Inc.), des antivitamines K et des hirudines. Les hirudines, par exemple la Lepirudin (Refludan[®]) commercialisée par Behringwerke AG - Hoechst Marion Roussel ou la Desirudin (Revasc[®]) commercialisée par Novartis - Rhône Poulenc Rorer, peuvent entraîner, au même titre que l'héparine non fractionnée, un risque hémorragique important.

En thrombose artérielle, deux classes de composés sont utilisables ou à l'étude (Samama M. M. et Desnoyer P. C., « Les bases pharmacologiques des traitements antithrombotiques - Agents antithrombotiques actuels et futurs », 1995, Edition Masson) : il s'agit des antiagrégants plaquettaires, par exemple l'acide acétylsalicylique, le dipyridamole, la ticlopidine, le clopidogrel, l'anticorps anti-GPIIb/IIIa, et des fibrinolytiques (streptokinase, urokinase, etc), qui dissolvent le caillot par activation du système fibrinolytique et libération de la plasmine (enzyme protéolytique capable de lyser rapidement le caillot de fibrine).

L'utilisation de ces composés doit souvent être associée à une intervention endoscopique pour élargir la lumière de l'artère rétrécie, telle qu'une angioplastie. Or, ces traitements ne sont pas suffisamment efficaces à moyen terme, car une resténose des artères

ainsi désobstruées survient fréquemment, et ce dans les quelques mois qui suivent le traitement.

Ainsi, il apparaît que les agents antithrombotiques décrits ci-dessus ne permettent pas de
5 prévenir ou de traiter de façon efficace une thrombose artérielle ou une resténose, problème essentiel après une angioplastie. Suite à une telle chirurgie, l'endothélium présente un dysfonctionnement par rapport à l'endothélium d'origine. L'agression pariétale induite par cette
10 chirurgie peut se traduire par un phénomène de décompartmentation : perte de l'endothélium et communications directes entre le compartiment sanguin et les cellules musculaires lisses. A cette agression, la paroi répond par un processus associant une migration, une
15 prolifération, une destruction et une sécrétion de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses en position intimale, suivi d'une repousse de l'endothélium, ce qui contribue à son épaississement et donc au rétrécissement de sa lumière. Ce phénomène de
20 cicatrisation pariétale peut participer à la pathologie elle-même, comme les sténoses anastomotiques sur les prothèses vasculaires et les resténoses après dilatation endoluminale.

Au vu de l'état actuel de la technique, le
25 besoin d'un agent actif contre la thrombose et la resténose artérielles se fait donc ressentir.

Les Inventeurs se sont ainsi donnés pour but de pourvoir à un agent qui puisse être utilisé pour l'obtention d'un médicament actif contre la thrombose et
30 la resténose artérielles, ledit médicament :

- présentant une activité contre la thrombose vasculaire, notamment contre la thrombose veineuse, et de façon particulièrement avantageuse contre la thrombose artérielle, et ce lorsqu'il est administré par voie
35 parentérale,

- ne présentant pas de risque hémorragique majeur,

- ne présentant pas le risque potentiel de contamination virale lié aux produits d'origine animale,

5 - permettant d'obtenir une prévention de l'occlusion artérielle dans le cadre de la prévention de la resténose, en particulier à la suite d'une angioplastie.

Les Inventeurs ont maintenant trouvé que, de
10 manière inattendue, ces buts sont atteints par l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté susceptible d'être obtenu par dépolymérisation radicalaire d'un fucane brut issu de Phéophycées, ledit polysaccharide ayant une masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol.

15 La présente invention a pour objet l'utilisation d'un polysaccharide sulfaté susceptible d'être obtenu par dépolymérisation radicalaire d'un fucane brut issu de Phéophycées, ledit polysaccharide ayant une masse molaire inférieure ou égale à
20 10 000 g/mol, pour l'obtention d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose vasculaire.

De façon particulièrement avantageuse, l'utilisation d'un tel polysaccharide sulfaté permet
25 d'obtenir un effet antithrombotique qui n'est pas accompagné d'un risque hémorragique majeur.

Ledit polysaccharide sulfaté est susceptible d'être obtenu comme décrit dans la Demande de Brevet EP 0 846 129. A titre d'exemple, le type de Phéophycées
30 dont est issu ledit polysaccharide sulfaté est *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus*, *Pelvetia canaliculata* ou *Undaria pinnatifida*.

De façon particulièrement avantageuse, l'origine végétale du polysaccharide utilisé dans la
35 présente invention élimine tout risque de contamination virale du sujet auquel il est administré.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'utilisation selon l'invention, ledit médicament est destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose veineuse.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'utilisation selon l'invention, ledit médicament est destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose artérielle, processus dans lequel la formation du thrombus et les dépôts plaquettaires jouent un rôle
10 important.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit médicament est destiné à la prévention de la resténose artérielle, phénomène précurseur d'une thrombose artérielle.

15 En effet, dans le cadre de la prévention de la thrombose artérielle, il est particulièrement avantageux de chercher à prévenir la resténose artérielle, pathologie qui, lorsqu'elle se déclare, peut aboutir à une thrombose de l'artère.

20 Le polysaccharide sulfaté utilisé dans la présente invention a avantageusement une masse molaire inférieure à 5 000 g/mol.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la présente invention, ledit médicament est destiné à
25 être administré par voie parentérale, de préférence par voie intraveineuse ou sous-cutanée.

Chez le lapin, dans un modèle de thrombose veineuse expérimentale, après injection par voie sous-cutanée, une même activité antithrombotique est observée
30 pour des doses d'HBPM et de polysaccharide sulfaté (polysaccharide susceptible d'être obtenu par dépolymérisation radicalaire d'un fucane brut issu de Phéophycées, comme décrit ci-dessus) respectivement égales à 1 mg/kg et à 10 mg/kg, c'est-à-dire pour une dose de
35 polysaccharide sulfaté 10 fois supérieure à celle d'une HPBM.

Si une extrapolation chez l'homme est possible, les doses journalières dudit médicament sont de préférence comprises entre 150 et 300 mg (administration de façon préventive) ou entre 450 et 600 mg (administration de façon curative) par voie sous-cutanée ;
il est bien entendu toutefois que l'Homme de l'Art adaptera ces doses en fonction de l'âge, du poids et de la pathologie du patient, notamment en fonction du risque thrombogène.

Dans le mode de mise en oeuvre relatif à la prévention de la resténose artérielle, ledit médicament est avantageusement destiné à être administré par voie locale, par exemple par diffusion endopariétale.

La diffusion endopariétale consiste en une administration locale de la composition pharmaceutique, par exemple au moyen d'un ballonnet. Le passage répété du ballonnet, lors de l'intervention chirurgicale d'angioplastie, a pour effet de supprimer l'endothélium et de stresser les cellules musculaires et la matrice extracellulaire de la media. En réponse à la désendothélialisation, une agrégation plaquettaire va se reproduire au site de la lésion, libérant localement du PDGF (Platelet Derived Growth Factor). En réponse au stress médial, le FGF intracellulaire stocké dans la matrice va être relargué. Ces facteurs de croissance vont induire l'activation, la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses.

La technique de diffusion endopariétale permet une distribution topique endovasculaire du principe actif présent dans ladite composition pharmaceutique. Différents types de ballons peuvent être utilisés, tels que des cathéters à doubles ballonnets isolant une chambre de perfusion ou des ballonnets enduits de gel, ou encore des cathéters non occlusifs.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui

ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mesure de l'activité antithrombotique, du risque hémorragique et de l'effet anticoagulant de polysaccharides sulfatés obtenus par
5 dépolymérisation d'un fucane de Phéophycées, ainsi qu'à l'étude des effets de ces polysaccharides sur l'agrégation plaquettaire.

Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de
10 l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : ACTIVITE ANTITHROMBOTIQUE DE POLYSACCHARIDES SULFATES OBTENUS PAR DEPOLYMERISATION D'UN FUCANE DE PHEOPHYCEES

15 **1. Préparation du fucane de bas poids moléculaire et de ses références**

Dans cet exemple et dans ceux qui suivent, sauf indication contraire, les références du fucane de bas poids moléculaire sont les suivantes :

- 20 - l'héparine standard non fractionnée (HNF) est une héparine TERHORMON TH/023 (150 UI/mg) fournie par Terdobliate (Novara, Italie). Sa masse moléculaire moyenne est d'environ 15 000 g/mol ;
- l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM)
25 est fournie par Pharmacia (France) sous la dénomination Fragmine® (lot 94134, 2 500 UI anti-Xa/0,2 ml). Sa masse moléculaire moyenne est d'environ 5 000 g/mol.

Les concentrations requises en HNF et en HBPM sont obtenues par dilution avec du sérum physiologique.

30 Le fucane de bas poids moléculaire (FBPM) utilisé est obtenu par dépolymérisation radicalaire d'un fucane de Phéophycées (*Ascophyllum nodosum*) conformément au procédé décrit dans la Demande de Brevet EP 0 846 129. Le protocole mis en oeuvre est le suivant :

- Dépolymérisation radicalaire.

25 litres d'extrait aqueux de fucane, obtenu selon le protocole décrit par Nishino et al. (Carbohydrate Research, 1989, 186, 119-129) adapté à l'algue *Ascophyllum nodosum*, sont introduits dans un réacteur d'une capacité de 45 litres muni d'un dispositif d'agitation à 100 tours/minutes. La température est portée et maintenue à 60°C. 75 g d'acétate de cuivre (Fluka) sont ajoutés, soit une concentration de 0,02 M en acétate de cuivre. Le pH est ajusté à 7,5 à l'aide d'environ 400 ml de soude 2 N (NaOH à 400 g/l, Panréac). On ajoute alors du peroxyde d'hydrogène à une concentration de 10 à 13% à un débit de 85 ml/minutes, pendant 4 h.

15 - Élimination du cuivre.

Le milieu réactionnel est filtré sur des filtres en microfibres de verre dont le diamètre des pores est de 2,6 µm (filtres Wathman de référence GF/D 1823-150), afin d'éliminer le précipité de couleur verte formé lors de la réaction de dépolymérisation. Le cuivre résiduel est ensuite retenu par un passage sur une résine (Chelex® 20, Biorad) : l'extrait dépolymérisé est introduit, à un débit de 13 à 15 l/h, dans une colonne de verre d'une section de 113 cm² contenant 5 litres de résine préalablement passivée. En sortie de colonne, la solution de fucane dépolymérisé est décolorée et a un pH compris entre 10 et 11.

La résine utilisée est ensuite régénérée selon les conditions opératoires données par le fabricant.

30 - Diafiltration, concentration et lyophilisation.

La solution de fucane dépolymérisé obtenue ci-dessus est soumise à une ultrafiltration sur un système Pellicon® (Millipore) équipé de deux membranes polysulfones de 1 kDalton (Filtron). Un suivi de

conductivité est effectué tout au long de ce procédé, réalisé avec 10 volumes d'eau osmosée.

Après concentration jusqu'à un volume final de 4 à 5 litres, le produit est lyophilisé. Le rendement, calculé sur le lyophilisat, est de 27%.

- Réduction au borohydruure.

267 g du fucane dépolymérisé obtenu ci-dessus (fucane lyophilisé) sont dissous dans 3 l d'eau osmosée et la solution est homogénéisée. 10 ml de cette solution sont prélevés pour analyse du fucane avant l'étape de réduction des monosaccharides terminaux des chaînes polysaccharidiques.

Séparément, 202 g de borohydruure de sodium sont dissous dans 3 l d'eau. La solution de borohydruure est ensuite ajoutée à la solution de fucane. La réaction est immédiate et très effervescente. Après 2 heures, la réaction est stoppée par addition d'acide acétique 10 N (acide acétique glacial, Panréac) jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le volume d'acide ajouté est de 400 ml.

Après neutralisation, la solution est filtrée sur microfibres de verre (fitre Wathman de référence GF/D 1822-290) et soumise à une ultrafiltration/diafiltration sur un système Pellicon® (Millipore) équipé de deux membranes polysulfones de seuil de coupure de 1 kDalton (Filtron). Le volume initial est de 9 l ; la conductivité initiale est de 16,5 mS et chute à 3,5 mS en fin d'ultrafiltration/diafiltration. Après une concentration jusqu'à 7,5 l, le produit est filtré successivement sur des filtres de diamètres de pores de 2,6 µm (GF/D Wathman), puis 0,7 µm (GF/F Wathman) et enfin 0,2 µm (filtres Wathman en nitrate de cellulose, référence 7182-09). Le volume final à lyophiliser est de 7,75 l. Le rendement global de la réduction est de 60%, cette faible valeur étant due aux nombreuses manipulations réalisées lors de cette étape.

Le rendement total du procédé d'obtention d'un fucane de bas poids moléculaire (dépolymérisation et réduction) est par conséquent de 16,2%.

L'étape de réduction ne modifie pas l'activité
5 anticoagulante et la composition chimique du fucane, comme cela sera détaillé ci-après (cf. tableau I).

Le tableau I résume les caractéristiques du produit (fucane dépolymérisé) avant et après l'étape de réduction, à savoir sa masse molaire (M_c : masse molaire chromatographique déterminée au sommet du pic), son
10 indice de polydispersité (correspondant au rapport M_p/M_n , avec M_p : masse moléculaire moyenne en poids et M_n : masse moléculaire moyenne en nombre), sa teneur en oses neutres (fucose, galactose, xylose), en acide uronique, en
15 sulfate (SO_3Na), ainsi que la mesure de l'activité anticoagulante du produit par TCA (Temps de Céphaline Activée), exprimée en quantité de produit ajoutée à 1 ml de PPP (Plasma Pauvre en Plaquettes) nécessaire pour doubler le temps de coagulation témoin (39 secondes).

20 La teneur en oses neutres a été mesurée selon la technique décrite par Mopper et al. (environ. Sci. Technol., 1992, 25, n°1, 133-138). Les autres paramètres ont été mesurés comme indiqué dans la Demande de Brevet EP 0 846 129.

25 Il ressort du tableau I que le procédé de réduction décrit ci-dessus, réalisé après la dépolymérisation radicalaire, permet d'obtenir un fucane de bas poids moléculaire peu polydisperse, sans modifier globalement sa composition chimique et sans le
30 désulfater.

Tableau I

	Fucane avant dépolymérisation (extrait aqueux)	Fucane dépolymérisé, avant réduction	Fucane dépolymérisé, après réduction
Mc (g/mol)	> 600 000	< 5000	< 5000
indice de polydispersité	5	1,9	1,7
fucose (%)	28,4	32,8	34,3
galactose (%)	3,4	1,6	1,4
xylose (%)	3,7	1,2	1,0
acide uronique (%)	8,5	3,7	2,7
SO ₃ Na (%)	22,7	34,2	32,3
TCA (activité anticoagulante) (µg/ml de PEP)	nd*	25	25

* nd : non déterminé

2. Thrombose veineuse selon Wessler chez le lapin5 Protocole

La thrombose veineuse expérimentale est celle de Wessler et al. (1959) utilisant le facteur X activé (FXa) comme agent hypercoagulant (Mauray et al., Throm. Haemost., 1995, 74, 1280-5 et Millet et al., Throm. Haemost., 1992, 67, 176-9).

Comme décrit par Millet et al. (Throm. Haemost., 1999, 81, 391-395), les produits sont administrés par voie sous-cutanée, un effet dose et une cinétique de l'effet étant réalisés.

15 Résultats

Le FBPM présente une activité dose dépendante qui se manifeste dès la dose de 2,5 mg/kg, avec un abaissement significatif et voisin de 35% du poids des thrombi. Cette activité est proche de 100% pour la dose de 10 mg/kg.

Des activités de 50%, 80% et 90% ont été obtenues pour des doses respectives de Fragmine® de 80, 100 et 200 UI anti-Xa/kg (Millet et al., 1999, *ibid*).

Le calcul mathématique, utilisant une régression logarithmique, permet la détermination de la dose de FBPM nécessaire pour diminuer de 80% (DE 80) le poids des thrombi témoins. Ainsi, la DE 80 du FBPM, par vois sous-cutanée, est de 7,4 (5,6-9,8) mg/kg.

Comme observé par Millet et al., 1999 (*ibid*) sur le fucane de bas poids moléculaire obtenu par hydrolyse acide et en prenant la Fragmine® comme produit de référence, le FBPM montre, chez le lapin, une cinétique de l'activité antithrombotique plus précoce et plus durable.

3. Thrombose artério-veineuse selon Umetsu chez le lapin

3-a : activité antithrombotique en intraveineux

• Protocole

Les animaux utilisés sont des lapins mâles néo-zélandais homozygotes de 2 à 2,5 kg de poids moyen. Après une stabulation des animaux durant 6 jours en animalerie, ceux-ci sont utilisés en période de jeûne.

Après prémédication des animaux à l'Imalgène®, ceux-ci sont anesthésiés par une injection intraveineuse de pentobarbital sodique à 1% dans la veine marginale de l'oreille. L'injection se fait lentement avec un contrôle du réflexe pupillaire et de la respiration. Environ 4 à 5 ml de pentobarbital sont injectés à un lapin de 2 kg.

Une artère carotide et une veine jugulaire opposée sont dégagées. Un shunt artério-veineux est placé entre ces deux vaisseaux. Ce shunt est composé de 2 cathéters en polyéthylène (diamètre extérieur de 1,9 mm) de 12,5 cm de longueur, ces deux cathéters étant reliés entre eux par un troisième cathéter d'un diamètre intérieur de 1,57 mm et d'une longueur de 6 cm, à l'intérieur duquel est placé un fil de soie.

Les cathéters sont siliconés (Sigmacote®, Sigma). Une bague Doppler de 1,3 mm de diamètre est fixée autour du cathéter introduit dans la carotide afin d'apprécier la variation de vélocité du flux sanguin, représentative de l'occlusion.

Un premier groupe de lapins, qui servira de contrôle, reçoit du sérum physiologique, trois autres groupes recevant respectivement une solution d'HNF (1 mg/kg) et deux solutions de FBPM (1 mg/kg et 2 mg/kg). Les diverses solutions et leurs solvants (le sérum physiologique) sont administrées sous un volume de 1 ml/kg, par injection intraveineuse dans une veine marginale de l'oreille (opposée à celle servant au maintien de l'anesthésie de l'animal), 5 minutes avant la création de la situation thrombogène.

• Résultats

Le tableau II résume les temps d'occlusion (en minutes) en fonction des doses de FBPM et d'HNF administrés par injection intraveineuse. Le symbole *** indique le seuil de significativité d'une probabilité égale ou inférieure à 0,1% ($p \leq 0,001$ dans le test statistique de Student).

Tableau II

	Témoin	HNF 1 mg/kg	FBPM	
			1 mg/kg	2 mg/kg
Temps d'occlusion (min.)	15,6 ± 1,7	55,4 ± 2,9***	27,6 ± 6,5	43,7 ± 6,0***
Nombre d'animaux	9	5	7	6

25

Il ressort de ces résultats que le FBPM, administré par voie intraveineuse dans le modèle de Umetsu adapté au lapin, présente une activité antithrombotique artérielle à des doses proches de celles responsables d'une activité antithrombotique veineuse.

30

Un doublement du temps d'occlusion est noté 5 minutes après une administration par voie intraveineuse de FBPM à la dose de 1 mg/kg (dose voisine de la DE 80 antithrombotique veineuse). L'HNF administrée à la dose de 1 mg/kg, dans les mêmes conditions, augmente de près de 4 fois le temps nécessaire pour l'obtention d'une obstruction vasculaire totale chez les animaux témoins. Par ailleurs, il faut noter que cette dose correspond à 10 fois la DE 80 antithrombotique veineuse de l'HNF.

10 3-b : activité antithrombotique en sous-cutané

• Protocole

On procède comme indiqué ci-dessus, les diverses solutions et leurs solvants (le sérum physiologique) étant administrées sous un volume de 15 1 ml/kg, par voie sous-cutanée, 2 heures avant la création de la situation thrombogène. Les animaux sont répartis en trois groupes : un premier groupe, qui servira de contrôle, reçoit du sérum physiologique, alors que les autres groupes reçoivent respectivement des 20 solutions de FBPM à la dose de 7,5 mg/kg et d'HBPM à la dose de 60 UI anti-Xa/kg.

• Résultats

Le tableau III résume les temps d'occlusion (en minutes) en fonction des doses de FBPM et d'HBPM 25 administrés par injection sous-cutanée.

Tableau III

	Témoin	HBPM (60 UI anti-Xa/kg)	FBPM (7,5 mg/kg)
Temps d'occlusion (min.)	12,6 ± 1,0	11,8 ± 1,3	22,8 ± 3,4
Nombre d'animaux	5	4	4

Il ressort de ces résultats qu'aux doses testées en sous-cutané, le FBPM double le temps d'occlusion témoin, alors que l'HBPM n'a aucun effet.

Contrairement à ce qui est noté pour l'HNF (en 5 injection intraveineuse) et pour l'HBPM (injection sous-cutanée), la dose de FBPM nécessaire pour doubler le temps d'occlusion artériel est très proche de la DE 80 antithrombotique veineuse (à savoir 7,4 mg/kg), à la 10 différence des héparines, pour lesquelles il est nécessaire de multiplier par un facteur voisin de 10 la dose antithrombotique veineuse pour obtenir une dose active en thrombose artérielle.

4. Thrombose artérielle au FeCl₃ chez le rat

• Protocole

15 Seule l'administration par voie intraveineuse a été étudiée dans ce modèle.

Les animaux utilisés sont des rats mâles Wistar de poids variant de 240 à 390 g. Après une stabulation des animaux durant 6 jours en animalerie, 20 ceux-ci sont utilisés en période de jeûne.

Après une anesthésie au carbonate d'éthyle à 15% (10 ml/kg ; Prolabo, Paris, France), une artère carotide est exposée, soigneusement dégagée des tissus ou des nerfs environnants et un carré de parafilm est placé 25 sous la carotide. Une sonde Doppler est placée autour de la carotide (côté céphalique). Le signal Doppler est ajusté de manière à avoir une déflexion maximale et assimilée à une valeur de 100%.

Après une période de stabilisation du flux 30 sanguin, un disque (3 mm de diamètre) de papier filtre Whatman est placé sur la carotide de manière distale par rapport à la sonde. Deux microlitres d'une solution de FeCl₃ (Osi, Paris, France) à 25% dans de l'acide chlorhydrique 1 M sont déposés sur le papier filtre, qui 35 est alors placé à la verticale du parafilm au contact de la carotide dégagée. Un chronomètre est déclenché. Après

30 secondes de contact du papier filtre, celui-ci est enlevé. La formation du thrombus est alors suivie par l'analyse du signal Doppler.

5 L'évaluation de la thrombose, exprimée en minutes, consiste à mesurer l'intervalle de temps séparant l'application du FeCl₃ du moment où le signal Doppler rejoint la ligne de base, traduisant ainsi une occlusion totale.

10 Les animaux sont répartis en trois principaux groupes, l'un recevant le sérum physiologique (groupe de contrôle), et les autres recevant respectivement le FBPM (à des doses variant de 1,25 à 10 mg/kg) et l'HNF (aux doses de 1,25 et 2,5 mg/kg). Le sérum physiologique, ainsi que les solutions de FBPM et d'HNF, sont injectées
15 par voie intraveineuse, sous un volume de 1 ml/kg, 5 minutes avant l'induction de la thrombose.

• Résultats

Le tableau IV résume les temps d'occlusion artérielle (en minutes), ainsi que le facteur de
20 multiplication du temps d'occlusion (calculé par rapport au temps d'occlusion témoin), en fonction des doses de FBPM et d'HNF administrés par voie intraveineuse. Les symboles *** et ** indiquent les seuils de significativité d'une probabilité respectivement égale ou inférieure à
25 0,1% et 1% (respectivement, $p \leq 0,001$ et $p \leq 0,01$ dans le test statistique de Student).

Tableau IV

	temps d'occlusion (min.)	facteur de multiplication	nombre d'animaux
témoin	11,6 ± 0,58	/	19
FBPM :			
10 mg/kg	52,5 ± 7,5***	4,52	6
5 mg/kg	41,7 ± 8,9***	3,59	7
2,5 mg/kg	31,9 ± 9,3**	2,75	6
1,25 mg/kg	12,7 ± 1,4	1,09	5
HNF :			
2,5 mg/kg	60,0 ± 0***	5,17	2
1,25 mg/kg	20,5 ± 0,5**	1,76	3

Comme le montre le tableau ci-dessus, le temps d'occlusion est de 20,5 minutes après une injection d'HNF à la dose de 1,25 mg/kg et est de 60 minutes lorsque l'HNF est administrée à la dose de 2,5 mg/kg, soit plus de 5 fois le temps témoin.

Quant au FBPM, il présente une activité significative dose dépendante. Dès la dose de 2,5 mg/kg, l'injection de FBPM induit un retard significatif du temps d'occlusion artériel, temps qui apparaît plus que doublé par rapport au temps témoin.

Un calcul mathématique (régression linéaire) permet de déduire des résultats ci-dessus les doses de FBPM et d'HNF nécessaires pour doubler le temps d'occlusion artérielle, qui sont voisines de 2 mg/kg pour le FBPM et de 1,25 mg/kg pour l'HNF.

EXEMPLE 2 : RISQUE HÉMORRAGIQUE ET EFFET ANTICOAGULANT DE POLYSACCHARIDES SULFATES OBTENUS PAR DEPOLYMERISATION D'UN FUCANE DE PHEOPHYCEES

1. Risque hémorragique chez le lapin

a) Matériel et méthode

Chez le lapin, le risque hémorragique du FBPM et de l'HBPM est évalué par la mesure de l'allongement des temps de saignement, selon le modèle de Carter et al.

modifié par Doutremepuich et al. (Throm. Res., 1979, 15, 581-586), après administration des produits par voie sous-cutanée, 2 heures avant l'induction de l'hémorragie, à des doses proches de la DE 80 antithrombotique veineuse et de 5 fois cette dose.

Le fucane de bas poids moléculaire (FBPM) et les animaux utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1. Dans le cas de l'injection à 1 x DE 80, l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM) est la Fragmine[®] telle que décrite dans l'exemple 1 ; dans le cas de l'injection à 5 x DE 80, il s'agit de la Tinzaparine[®] (10 000 UI anti-Xa/0,5 ml ; lot Q 6369B), fournie par la Société Innohep (France).

b) Résultats

A la dose permettant de doubler le temps témoin d'occlusion artérielle, correspondant à la DE 80 antithrombotique veineuse, le FBPM et l'HBPM administrés par voie sous-cutanée n'ont pas d'activité hémorragipare. On note également qu'à cette dose, et à la différence du FBPM, l'HBPM est inactive chez le lapin dans le modèle de thrombose artérielle selon le modèle d'Umetsu.

A 5 fois cette dose, ni l'HBPM, ni le FBPM n'induisent une augmentation significative du temps de saignement.

2. Risque hémorragique chez le rat

a) Matériel et méthodes

Chez le rat, le risque hémorragique du FBPM, de l'HNF et de l'HBPM est évalué par la mesure de l'allongement des temps de saignement, selon le modèle de Dejana et al. (Throm. Haemost., 1982, 48, 108-111). Le FBPM, l'HNF et les animaux utilisés sont identiques à ceux décrits dans l'exemple 1.

Les composés sont administrés par voie intraveineuse à des doses de 5 et 10 mg/kg pour le FBPM (doses correspondant respectivement à 2,5 fois et à

5 fois la dose doublant le temps d'occlusion (TO) témoin (cf. tableau IV), de 750 et 1 500 UI anti-Xa/kg pour l'HBPM (Fragmine®) et de 1 mg/kg pour l'HNF, 5 minutes avant l'induction de l'hémorragie.

5 b) Résultats

Le tableau V résume, en pourcentages, l'allongement des temps de saignement obtenus.

Tableau V

doses	produits	allongement des temps de saignement	nombre d'animaux
1 X TO x 2	FBPM	nd*	9
	HNF	>80%	
2,5 X TO x 2	FBPM	>50%	8
	HBPM	>200%	8
5 X TO x 2	FBPM	>200%	3
	HBPM	>200%	3

10 * nd : non déterminé

Il ressort de ce tableau qu'à 2,5 fois la dose nécessaire pour doubler le temps d'occlusion témoin, le FBPM augmente bien moins le temps de saignement que l'HBPM. A 5 fois cette dose, les allongements des temps de saignement sont similaires pour les deux produits.

Ainsi, en comparaison à une HNF et à une HBPM, il ressort du tableau V que le FBPM présente un risque hémorragique modéré.

20 3. Effet anticoagulant ex vivo

a) Matériel et méthode

On utilise les plasmas provenant :

- de lapins dans lesquels une thrombose veineuse selon le modèle de Wessler a été induite ;

25 - des rats utilisés dans l'expérience de thrombose artérielle selon l'exemple 1, ces rats ayant reçu, par voie intraveineuse, des doses proches de celle nécessaire pour doubler le temps d'occlusion témoin, soit

2,5 mg/kg de FBPM ou 1,25 mg/kg d'HNF, ou des doses doubles, c'est-à-dire 5 mg/kg de FBPM ou 2,5 mg/kg d'HNF.

L'injection d'une solution saline physiologique sert de contrôle. Le plasma des animaux est
5 prélevé juste après la formation du sac veineux.

La mesure du temps de céphaline activé (TCK ou TCA) est effectuée comme suit :

- pour les plasmas prélevés chez les lapins, 100 µl de plasma et 100 µl de réactif CKPrest (Stago,
10 Asnières, France) sont incubés pendant 3 minutes à 37°C, puis on ajoute 100 µl de CaCl₂ pour déclencher la coagulation. On obtient ainsi une mesure du TCK (Temps de Céphaline Kaolin) ;

- pour les plasmas prélevés chez les rats, le
15 TCA est mesuré sur l'automate ACL 3000 (Delhomme, Paris, France). 53 µl de plasma et 53 µl de céphaline activée par de l'acide ellagique (fourni par IL, Paris, France, sous la référence 97570-10) sont mis en contact, après incubation à 37°C. La coagulation est déclenchée par
20 l'adjonction de 53 µl de CaCl₂. L'augmentation de la turbidité due à la formation du caillot fibrineux est détectée par néphélométrie.

La mesure du temps de thrombine (TT) est effectuée comme suit :

25 - pour les plasmas prélevés chez les lapins, on met en présence 100 µl de thrombine (thrombine humaine fournie par Fibrindex Ortho Diagnostic Système, Roissy, France) avec 200 µl de plasma, après incubation pendant 2 minutes à 37°C. L'addition de la thrombine au plasma
30 déclenche le processus de formation du caillot de fibrine ;

- pour les plasmas prélevés chez les rats, le TT est mesuré sur l'automate ACL 3000 décrit ci-dessus. Le plasma et la thrombine humaine (référence 0880, Stago,
35 Asnières, France), après incubation à 37°C, sont mis en contact volume à volume (75 µl). La formation d'un

caillot de fibrine augmente la turbidité, qui est détectée par néphélométrie sur l'automate de coagulation.

b) Résultats

5. • Effet anticoagulant chez le rat
(administration des composés par voie intraveineuse).

Chez le rat, l'injection intraveineuse de FBPM prolonge le TCA et le TT de façon significative, mais de façon bien inférieure à ce qui est observé avec l'HNF.

10. • Effet anticoagulant chez le lapin
(administration des composés par voie sous-cutanée).

15. Les résultats des TCK obtenus chez le lapin, exprimés en secondes, sont résumés dans le tableau VI ci-dessous. Les symboles ' et '' indiquent les seuils de significativité d'une probabilité respectivement égale ou inférieure à 5% et 1% (respectivement, $p \leq 0,05$ et $p \leq 0,01$ dans le test statistique de Student).

20

Tableau VI

	dose	TCK (secondes)	nombre d'animaux
contrôle	0	25,1 ± 1,3	8
FBPM	7,5 mg/kg	28,2 ± 1,8	6
	10 mg/kg	29,4 ± 1,5*	7
HBPM	50 UI anti-Xa/kg	25,7 ± 1,7	3
	100 UI anti-Xa/kg	27,0 ± 1,5	3
	200 UI anti-Xa/kg	33,9 ± 5,0**	3

25. Il ressort du tableau VI que l'HBPM (Fragmine®), administrée à des doses allant de 50 à 200 UI anti-Xa/kg, 2 heures avant les prélèvements sanguins, n'induit qu'à une très forte dose (200 UI anti-Xa/kg) une élévation significative du TCK (35,3% d'augmentation par rapport au groupe de contrôle).

Le TCK ne subit aucune modification significative pour la dose de FBPM de 7,5 mg/kg, administrée par voie sous-cutanée 2 heures avant les prélèvements sanguins. A la dose de 10 mg/kg, on note une augmentation discrète, mais significative (17% d'augmentation).

Les résultats des TT obtenus chez le lapin, exprimés en secondes, sont résumés dans le tableau VII ci-dessous. Le symbole " indique le seuil de significativité d'une probabilité égale ou inférieure à 1% ($p \leq 0,01$ dans le test statistique de Student).

Tableau VII

	dose	TT (secondes)	nombre d'animaux
contrôle	0	$31,6 \pm 1,3$	9
FBPM	7,5 mg/kg	$34,7 \pm 2,2$	6
	10 mg/kg	$31,5 \pm 1,2$	7
HBPM	50 UI anti-Xa/kg	$32,5 \pm 2,7$	3
	100 UI anti-Xa/kg	$38,2 \pm 4,1$	3
	200 UI anti-Xa/kg	$> 98''$	3

Il ressort du tableau VII que le temps de thrombine moyen (TT) ne subit aucune modification significative pour les doses de FBPM testées, administrées par voie sous-cutanée 2 heures avant les prélèvements sanguins. On note que l'HBPM (Fragmine[®]), aux doses testées, augmente le TT.

EXEMPLE 3 : ETUDE EX VIVO DE L'EFFET DE POLYSACCHARIDES SULFATES OBTENUS PAR DEPOLYMERISATION RADICALEIRE D'UN FUCANE DE PHEOPHYCEES SUR L'AGREGATION PLAQUETTAIRE

a) Matériel et méthode

Le FBPM et l'HNF sont tels que décrits dans l'exemple 1. L'HBPM est de la Tinzaparine[®], fournie par Innohep.

• Chez le lapin.

Le FBPM et l'HBPM sont injectés, par voie sous-cutanée, à dose voisine de 5 x DE 80 (5 fois la dose nécessaire pour diminuer de 80% le poids moyen des thrombi témoins) déterminée selon le modèle de thrombose veineuse selon Wessler (DE 80 de la Tinzaparine® par injection sous-cutanée : 80 UI anti-Xa/kg). Ainsi, le FBPM et l'HBPM sont injectés, aux doses respectives de 37,5 mg/kg et de 400 UI anti-Xa/kg. Quant à l'HNF, elle est administrée par voie intraveineuse à une dose voisine de 10 x DE 80, c'est-à-dire à raison de 1 mg/kg.

- Agrégation à la thrombine.

De la thrombine bovine à 100 U NIH (National Institute of Health)/ml, (Sigma, référence 4648), conservée à -70°C, est décongelée et diluée au 1/10 dans du sérum physiologique, puis conservée dans de la glace pendant la durée de l'expérimentation. A 300 µl de PRP (Plasma Riche en Plaquettes), obtenu par centrifugation du sang des animaux pendant 10 minutes à 400 g, et pré-incubés pendant 1 minute à 37°C, sont ajoutés 100 µl de tampon PBS et une quantité de thrombine (quantité voisine de 8 µl) nécessaire pour avoir une concentration finale proche de 0,2 U NIH/ml.

- Agrégation à l'ADP (adénosine diphosphate).

Une solution d'ADP à 100 µM (référence 0494, Stago, Asnières, France), conservée à -20°C, est décongelée, diluée au 1/25 et 1/12,5 dans du tyrode calcique (NaCl 138,6 mM ; KCl 2,8 mM ; NaHCO₃ 11,9 mM ; MgCl₂ 1,1 mM ; NaH₂PO₄ 0,33 mM ; glucose 11,2 mM ; CaCl₂ 4 µM ; Laboratoires FOURNIER) et mise dans de la glace pendant la durée de l'expérimentation. Après incubation de 300 µl de PRP à 37°C pendant 1 minute, l'agrégation plaquettaire est déclenchée par 100 µl d'une solution d'ADP (concentration finale de 1 et 2 µM).

• Chez le rat.

Le FBPM et l'HNF sont injectés par voie

intraveineuse, 5 minutes avant les prélèvements sanguins, aux doses respectives de 2,5 et 5 mg/kg pour le FBPM et de 1,25 et 2,5 mg/kg pour l'HNF.

Les protocoles d'agrégation plaquettaire sont similaires à ceux décrits ci-dessus, aux différences près suivantes pour le protocole d'agrégation à la thrombine : le tampon ajouté au PRP est un tampon tyrode recalifié, et la concentration finale en thrombine est de 0,6 U NIH/ml.

10 b) Résultats

• Chez le lapin.

Le FBPM et l'HBPM (à la dose de 5 x DE 80) et l'HNF (à la dose de 10 x DE 80) inhibent à 100% l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine, mais n'inhibent pas l'agrégation plaquettaire induite par 1 µM et 2 µM d'ADP.

• Chez le rat.

Le FBPM et l'HNF inhibent à 100% l'agrégation plaquettaire induite par la thrombine.

20 A l'inverse de ce qui est noté suite à l'injection d'HNF (absence d'inhibition ou très faible inhibition de l'agrégation plaquettaire), le FBPM, quelle que soit la dose injectée, réduit de 35 à 45% l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP, sans qu'un effet dose puisse être noté.

EXEMPLE 4 : ETUDE IN VIVO DE L'EFFET DE POLYSACCHARIDES SULFATES OBTENUS PAR DEPOLYMERISATION RADICALE D'UN FUCANE DE PHEOPHYCEES SUR LA PREVENTION DE LA RESTENOSE ARTERIELLE.

30 Le traitement des sténoses artérielles par voie endovasculaire est une technique couramment pratiquée. Elle consiste à introduire dans l'artère un ballonnet que l'on vient gonfler en regard de la sténose (opération d'angioplastie) dans le but de restaurer un calibre vasculaire normal. L'angioplastie est le plus souvent suivie de la pose d'un stent qui permet, grâce à

sa force d'expansion radiale, de maintenir le calibre de l'artère. Cette technique est fréquemment utilisée dans le traitement des sténoses athéromateuses coronaires, iliaques ou rénales. Le traumatisme pariétal induit par l'angioplastie et la pose de stent est malheureusement responsable d'une resténose du vaisseau dans 20 à 30% des cas chez l'homme. Cette resténose est en grande partie due à une prolifération et une migration des cellules musculaires lisses (CML) de la media vers l'intima du vaisseau. L'apparition d'une hyperplasie néointimale réduit le calibre du stent, favorise l'ischémie d'aval et est source, chez l'homme, d'une morbidité et d'une mortalité non négligeables.

Des fractions de polysaccharide sulfaté susceptibles d'être obtenues par dépolymérisation radicalaire d'un fucane brut issu de Phéophycées, ledit polysaccharide ayant une masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol, peuvent être utilisées, conformément à l'invention, pour prévenir la resténose artérielle, comme démontré ci-dessous dans un modèle de resténose chez le lapin, dans l'artère iliaque.

a) Matériel et méthode

Les animaux sont des lapins New Zealand d'un poids moyen de 3,5 à 4 kg. Ils sont anesthésiés au pentobarbital.

10 stents iliaques sont implantés chez 5 lapins. Un stent est positionné dans chaque artère iliaque (abord carotidien). La pose de chaque stent est précédée de 3 angioplasties d'une minute à 10 atmosphères (atm). Le stent est posé sous une pression de 10 atm pendant 30 secondes.

Les animaux sont ensuite traités pendant 14 jours avec le FBPM obtenu dans l'exemple 1, injecté 2 fois par jour en intramusculaire à la dose de 10 mg/kg/24 h. Le groupe témoin est constitué de 6 artères stentées chez 3 lapins.

Après 14 jours, les animaux sont sacrifiés. On prélève l'aorte abdominale basse et les artères iliaques, qui sont fixées sous pression (dans le formol) et incluses dans du métacrylate. On effectue ensuite des coupes au microtome afin de réaliser des analyses histologiques et histomorphométriques, et de calculer la surface des artères.

b) Résultats

Les mesures de surface réalisées (intima, media, rapports intima/media et intima/limitante élastique interne), rassemblées dans le tableau VIII (dans lequel « n » représente le nombre de mesures effectuées), indiquent une diminution de l'hyperplasie intimale dans le groupe d'animaux traités par le FBPM. Cette diminution de l'hyperplasie intimale est très importante (de l'ordre de 60%).

Il est également à noter qu'en plus de la diminution de la surface de l'intima et des rapports intima/media et intima/limitante élastique interne, le fucane n'a pas d'effet sur la surface de la media, ce qui révèle une inhibition spécifique de la prolifération des CML.

Tableau VIII

	Témoins (n = 6)	Animaux traités par le FBPM (n = 10)	Diminution (%)
intima e type	1,83 0,51	0,73 0,20	60
media e type	0,41 0,02	0,37 0,19	n.s.
intima/media e type	4,48 1,47	1,97 0,65	56
intima/LEI e type	0,35 0,08	0,17 0,06	52

e type = écart type,
n.s. = non significatif
LEI = limitante élastique interne

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle s'embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un polysaccharide sulfaté susceptible d'être obtenu par dépolymérisation
5 radicalaire d'un fucane brut issu de Phéophycées, ledit polysaccharide ayant une masse molaire inférieure ou égale à 10 000 g/mol, pour l'obtention d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose vasculaire.
- 10 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à la prévention ou au traitement de la thrombose veineuse.
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à la
15 prévention ou au traitement de la thrombose artérielle.
4. Utilisation selon la revendication 3 pour la prévention de la resténose artérielle.
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit
20 polysaccharide sulfaté a une masse molaire inférieure à 5 000 g/mol.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par voie
25 parentérale.
7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par voie intraveineuse.
8. Utilisation selon la revendication 6,
30 caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par voie sous-cutanée.
9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré, de façon préventive, à une dose
35 journalière comprise entre 150 et 300 mg.

10. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré, de façon curative, à une dose journalière comprise entre 450 et 600 mg.

5 11. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par voie locale.

10 12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné à être administré par diffusion endopariétale.